

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

This Page Blank (uspto)

08-952,741

PCT/JP96/01641

14.06.96

乙

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1995年 6月14日

REC'D 09 AUG 1996

WIP

出 願 番 号
Application Number:

平成 7年特許願第147257号

出 願 人
Applicant (s):

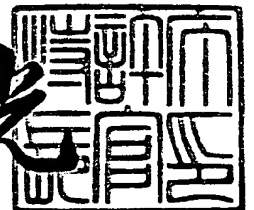
花王株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 7月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平08-3050848

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0415706
【提出日】 平成 7年 6月14日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 9/28
C12N 15/52
【発明の名称】 液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子
【請求項の数】 6
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 秦田 勇二
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 尾崎 克也
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 荒 勝俊
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 川合 修次
【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社研究所
内
【氏名】 伊藤 進

【特許出願人】

【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社
【代表者】 常盤 文克

【代理人】

【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317
【弁理士】
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【手数料の表示】

【納付方法】 予納
【予納台帳番号】 011752
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9002980

特平 7-147257

【包括委任状番号】 9002981

【包括委任状番号】 9002982

【包括委任状番号】 9206812

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 液化型アルカリ α -アミラーゼをコードするDNA断片。

【請求項2】 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするものである請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 配列番号1に記載のアミノ酸配列に対して1又は2以上のアミノ酸が置換、付加、欠失、逆位又は挿入されたアミノ酸配列を有し、液化型アルカリ α -アミラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA断片。

【請求項4】 遺伝子の発現調節のための塩基配列を有するものである請求項1～3のいずれかの項記載のDNA断片。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかの項記載のDNA断片を含有する組換えDNA。

【請求項6】 請求項5記載の組換えDNAを保持する形質転換微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする遺伝子、この遺伝子を含む組換えDNA及び形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】

古くから醸造産業で穀類やイモ類の糖化、繊維産業で澱粉糊抜き剤、医薬品産業で消化剤、食品産業で水飴の製造等に広く利用されてきた α -アミラーゼは、澱粉、アミロース、アミロペクチン等の澱粉系多糖類の分子中の α -1, 4グルコシド結合のみを切断する酵素で1833年にPayenとPersozにより初めて発見されて以来、細菌、黴類、植物の種子及び動物の消化腺など多くの生物から結晶標品あるいは電気泳動的に均一な標品として得られている。

【0003】

一方、本発明者らは、 α -アミラーゼを枝切り酵素と共に食器用洗浄剤及び衣

料用洗淨剤に配合することによって、主に澱粉汚れに対する洗淨力が飛躍的に向上することを明らかにした（特開平2-132192号公報）。しかしながら、自然界において従来見出されている α -アミラーゼのほとんどが、中性ないし酸性領域において最大且つ安定な酵素活性を示し、pH9~10のアルカリ性である食器用洗淨剤あるいは衣料用洗淨剤溶液中ではほとんど作用しないものであった。アルカリ領域において最大活性を示すいわゆるアルカリ α -アミラーゼ及びアルカリ耐性 α -アミラーゼの存在は、バチルス A-40-2株の生産する酵素 [Horikoshi, K. et al., Agric. Biol. Chem., 35, 1783 (1971)]、バチルス NRRL B-3881株の生産する酵素 [Boyer, E., J. Bacteriol., 110, 992 (1972)]、ストレプトマイセス属 KSM-9の生産する酵素（特開昭61-209528号公報）、バチルス H-167株の生産する酵素（特開昭62-208278号公報）、バチルス アルカリサーモフィラス A3-8株の生産する酵素（特開平2-49584号公報）及びナトロノコッカス属 Ah-36株（特開平4-211369号公報）が知られているのみであった。

【0004】

尚、ここでアルカリ α -アミラーゼとは、至適pHがアルカリ領域にあるものを言い、アルカリ耐性 α -アミラーゼとは、至適pHは、中性から酸性領域にあるが、アルカリ領域においても至適pHにおける活性に比較して十分に活性を有しかつ安定性を保持するものを言う。また、中性とはpH6~8の範囲を言い、アルカリ性とはそれ以上のpH範囲を言う。

【0005】

しかし、本発明者の知るかぎり、これらのアルカリ酵素のほとんどは、澱粉又は澱粉系多糖類をグルコース、マルトース又はマルトトリオースにまで低分子化させる、所謂糖化型 α -アミラーゼに属するものであるため、糖の製造用酵素としては好適であるが、洗淨剤用酵素としては問題があった。即ち、洗淨剤用のアルカリ α -アミラーゼとしては界面活性剤に対する耐性を有し、かつ澱粉又は澱粉系多糖類を高ランダムに分解する、所謂液化型 α -アミラーゼが必要とされる。そこで、本発明者らが洗淨剤用として適した液化型アルカリ α -アミラーゼを

生産する微生物を自然界に求めて鋭意探索を続けたところ、生育の至適pHをアルカリ性領域に有する、所謂好アルカリ性バチルス エスピー (Bacillus sp.) KSM-AP1378株が液化型アルカリ α -アミラーゼ活性を生産することを発見し、本酵素が食器用洗浄剤及び衣料用洗浄剤組成物の添加成分として有効であることを明らかにした(WO94/26881)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

液化型アルカリ α -アミラーゼの生産菌であるバチルス エスピー KSM-AP1378株に対して培養方法の検討や突然変異法による生産性の向上は有効な手段であるが、本酵素を工業的に高生産するためには、他の手法の導入が必要となる。近年、遺伝子工学の手法を用いて酵素の生産量を向上せしめることや、蛋白質工学的手法によって当該酵素の遺伝子を改変して当該酵素の改良を行うことも可能となっているが、液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする遺伝子は未だ取得されていなかった。

【0007】

従って本発明の目的は液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする遺伝子、これを含有する組換えDNAを保持する形質転換体を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、好アルカリ性バチルス属細菌の染色体DNAから液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を取得すべく鋭意検討した結果、液化型アルカリ α -アミラーゼをコードする約1.8kbのDNA断片を単離した。このDNA断片を適当なベクターに連結して宿主微生物に導入したところ、得られた組換え微生物が液化型アルカリ α -アミラーゼを生産することが確認できた。更に、コードされる液化型アルカリ α -アミラーゼのアミノ酸配列がこれまでに知られている他のアミラーゼとは全く異なることが明らかとなり、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、液化型アルカリ α -アミラーゼをコードするDNA断片

を提供するものである。

【0010】

また本発明は、上記液化型アルカリ α -アミラーゼをコードするDNA断片を有する組換えDNAを提供するものである。

【0011】

更にまた、本発明は上記液化型アルカリ α -アミラーゼをコードするDNA断片を有する組換えDNAを保持する形質転換微生物を提供するものである。

【0012】

本発明において、液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子の供与体となる微生物としては、例えば、好アルカリ性バチルス的一种、バチルス エスピー KSM-A P1378株を用いることができる。本菌株は、本発明者らが、菌体外に著量の液化型アルカリ α -アミラーゼを生産する菌株として栃木県栃木市の土壌より分離したものであり、微工研条寄第3048号 (FERM BP-3048) として寄託されている。

【0013】

供与菌株から染色体DNAを得る方法としては、例えばマーマーの方法 [Marmur, J., J. Mol. Biol., 3, 208 (1961)] や斉藤と三浦の方法 [Saito, H. and Miura, K., Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)] 等が挙げられるが、他の類似な方法を用いることもできる。

【0014】

かくして得られた染色体DNAを制限酵素で切断することによって、液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子を含むDNA断片を調製することができるが、用いる制限酵素の種類としては、当該遺伝子を分断しないものであれば、いかなるものでも使用できる。このような制限酵素の例として、Hind III が挙げられる。液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子の取得法については、PCR法 [Mullis, K. B. and Faloona, F.A., Methods Enzymol., 155, 335 (1987); Saiki, R. K. et al., Science, 239, 487 (1988)] を用いることができる。例えば、配列番号2に記載のヌクレオチド配列を基にして必須領域の5'末端の上流及び3'末端の下流位置にあたる配列のプライマーを合成し、液

化型アルカリ α -アミラーゼ生産菌の染色体DNAを鋳型としてPCR反応を行うことによって液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子を取得できる。あるいは、液化型アルカリ α -アミラーゼ生産菌より何らかの方法によって液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子の一部断片を取得した後、PCR法によってその上流部分及び下流部分遺伝子を増幅し、完全な遺伝子を取得することもできる。

【0015】

こうして、調製した当該遺伝子の断片をクローニングするが、この際用いる宿主・ベクター系としては、宿主菌株が本発明の液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子を発現させることができ、また、組換えDNA分子が宿主菌中で複製可能であり、組み込んだ当該遺伝子を安定に保持できるものであれば、いかなるものも使用することができる。例えば、大腸菌K-12系統株を宿主とするEK系や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Marburg系統株を宿主とするBS系等が挙げられるが、好適には、遺伝学的に最も良く研究されておりベクターの種類が豊富であるEK系を用いると良い結果が得られる。宿主菌株の具体例としては、EK系では、HB101株、C600株、JM109株、BS系ではBD170株、MI112株、ISW1214株などが挙げられる。また、ベクターとしては、EK系では、pBR322やpUC18等のベクター、また、BS系では、pUB110、pHY300PLKなどのベクターが挙げられる。

【0016】

ベクターを制限酵素で切断し、上記の染色体DNA断片と結合させ、組換えプラスミドDNA分子を作成するが、結合の方法としては、例えばDNAリガーゼによって結合させる方法等が挙げられる。

【0017】

組換えDNA分子による宿主菌株の形質転換の方法は特に制限されないが、例えば、EK系宿主菌株の場合、塩化カルシウム法 [Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159, (1970)] 等、またBS系宿主菌株の場合には、プロトプラスト法 [Chang, C. and Cohen, S. N., Mol. Gen. Genet., 168, 111, (1978)] 等を用いることができる。組換え微生物の選択は、先ずベクターDNA分子上にコードされている抗生物質耐性等の形質のうち、外

来染色体DNA断片の挿入によって失活しない形質を指標として、ベクター由来のDNA断片を含むDNA分子によって形質転換されたものを一次選択する。具体的には、例えばベクターとしてEK系のpBR322を用い、このHind III 切断部位に染色体DNAのHind III 断片を挿入した場合には、テトラサイクリン耐性遺伝子が失活するので、遺伝子中にHind III 切断部位を持たないアンピシリン耐性を指標として一次選択を行えば良い。次にこれを澱粉を含む寒天プレートにレプリカ法等によって移植して培養して集落を出現させた後、澱粉を含む寒天プレート中の澱粉をヨウ素液で染めることによって集落周囲の澱粉を分解した目的の組換え微生物を選択することができる。

【0018】

斯くして得られた組換え微生物が保持する組換えDNA分子は、通常のプラスミド調製法あるいはファージDNA調製法 [Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1982)] を用いて抽出でき、更に各種制限酵素による切断パターンを電気泳動法等によって解析することによって、組換えDNA分子がベクターDNA分子と液化型 α -アミラーゼ遺伝子を含むDNA断片が結合したものであることを確認できる。

【0019】

本発明に於ける液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子は図1に示した制限酵素地図を有する約2.1 kbのDNA断片に含まれおり、白帯で示した約1.6 kbの部分に存在しており、配列番号2に示したヌクレオチド配列を有している。本配列は配列番号2に示した約2.1 kb断片の左側から右側に向けての配列を5'から3'の方向に示したものである。本配列中にヌクレオチド番号145番のATGから翻訳を開始し、配列番号1に記載のアミノ酸516残基から成る配列をコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)が認められる。ORFの13ベース(b)上流に枯草菌の16SリボソームRNAの3'末端の配列 [McLaughlin, J. R. et al., J. Biol. Chem., 256, 11283 (1981)] と相補性が高いAAGGAG配列が存在し、更に上流には、ヌクレオチド番号9以降に σ^A 型プロモーターの共通配列 [Gitt, M. A. et al., J. Biol. Chem., 260, 7178 (1985)] と相同性の高いTTGAAA...16b...

・TATGGT配列、ヌクレオチド番号95以降にも σ^A 型プロモーターの共通配列と相同性の高いTTGACT・・・19b・・・TAAATT配列が存在する。また、バチルス エスピー KSM-AP1378株の培養液から精製した液化型アルカリ α -アミラーゼのアミノ末端側10残基のアミノ酸配列と、当該DNA断片中のヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列の37番号以降の配列は一致した（配列番号2のアミノ酸番号37～46）。

【0020】

本発明の遺伝子のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列をこれまでに知られている α -アミラーゼと比較したところ、本遺伝子は独自のヌクレオチド配列を有しており、且つコードされるアミノ酸の配列も他の α -アミラーゼのもの、例えば、バチルス アミロリケファシエンスの生産する液化型 α -アミラーゼ [Takkinen, K. et al., J. Biol. Chem., 258, 1007(1983)]、バチルス ステアロサーモフィラスの生産する液化型 α -アミラーゼ [Nakajima, R. et al., J. Bacteriol., 163, 401 (1985)]、バチルス リケニフォルミスの生産する液化型 α -アミラーゼ [Yuuki, T. et al., J. Biochem., 98, 1147 (1985)]、バチルス エスピー707の生産する液化型 α -アミラーゼ [Tsukamoto, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 151, 25 (1988)] などと異なっており新規なものであった。

【0021】

液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子の全領域を含む組換えDNA分子の好適な例として、プラスミドpAML100（図2）等が挙げられる。本プラスミドは液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子を含む1.8kb断片とpUC18からなる4.4kbの組換えプラスミドである。組換えDNA分子を含有する組換え微生物の好適な例としては、大腸菌HB101（pAML100）株が挙げられる。この菌株は組換えプラスミドpAML100を大腸菌HB101株に通常の形質転換法を用いて導入したものであり、大腸菌の培養に通常用いられる培地で培養することにより菌体内に液化型アルカリ α -アミラーゼを生産する。生産された当該酵素の最適反応pHはpH8～9であり、遺伝子の供与菌株であるバチルス エスピー KSM-AP1378株が生産する液化型アルカリ α -アミラーゼ（図

4) と良く一致する。

【0022】

目的とする酵素活性を有する蛋白をコードする限り、本発明のDNA断片には、後記配列表記載のアミノ酸配列をコードするものに限定されず、このアミノ酸配列に1又は2以上のアミノ酸が置換、付加、欠失、逆位又は挿入されたアミノ酸配列をコードするDNAが含まれる。その例としては、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から32アミノ酸を欠失したアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられる。

【0023】

【発明の効果】

本発明によればアルカリ性側pH領域において最大の活性を示す液化型アルカリ α -アミラーゼ遺伝子及びこれを含む微生物が得られ、これらを利用すれば当該液化型アルカリ α -アミラーゼの大量生産が可能である。

【0024】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。尚、本実施例中の濃度は何れも重量%で示してある。

【0025】

実施例1

液化型アルカリ α -アミラーゼを生産するバチルス エスピー KSM-AP 1378株を5mlのA培地(表1)に接種し、30℃で24時間振盪培養を行った後、この1mlを100mlの同培地に接種して30℃で更に12時間振盪培養した。この後、遠心分離によって菌体を集め、斉藤と三浦の方法[Saito, H. and Miura, K., Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]に従って約1mgの染色体DNAを得た。

【0026】

【表 1】

A 培地組成

可溶性澱粉	1.0%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02%
ポリペプトン	1.0%	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02%
酵母エキス	0.5%	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001 %
KH ₂ PO ₄	0.1%	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0001%
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.25 %	Na ₂ CO ₃	1.0 % (別滅菌)

【0027】

実施例 2

多くのアミラーゼファミリーにはアミノ酸配列の保存性が高い I ~ IV 領域があることが知られている [Nakajima, R. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 355 (1986)]。そこで、この I ~ IV 領域のうち既知の液化型 α-アミラーゼ間で特に配列の保存性の高い II 領域及び IV 領域それぞれの共通アミノ酸配列を基にして II 領域及び IV 領域に相応するプライマー (図 1、図 3) を合成し、合成したプライマーと鋳型として KSM-AP1378 株の染色体 DNA を用い、PCR (94℃ 1 分間, 42℃ 1 分間, 60℃ 2 分間を 30 サイクル) を行った。その結果、図 1 に示す様に約 0.3 kb の遺伝子断片 (断片 A) が増幅され、本断片の塩基配列を決定した。この結果、本断片には既知の液化型 α-アミラーゼの II 領域から IV 領域までのアミノ酸配列と高い相同性を示すアミノ酸配列がコードされていることが明らかになった。

【0028】

実施例 3

断片 A をプローブとし、制限酵素 Xba I で消化された KSM-AP1378 株の染色体 DNA に対しサザンハイブリダイゼーション解析を行った結果、約 1.0 kb の位置にハイブリダイズするバンドが確認された。そこで断片 A の両端の配列から合成したプライマー (II 領域側, プライマー 3 ; IV 領域, プライマー 4) 及び Xba I で消化された KSM-AP1378 株の染色体 DNA を分子内結

合したDNA群を鋳型として用いて逆PCR法 [Triglia, T. et al., Nucleic Acids Res., 16, 81 (1988)] によって0.7kbの増幅断片(断片B)を得ることができた(図1)。断片Bの塩基配列を決定した結果、本断片はII領域の11b上流からIV領域の約0.6kb下流までを含んでいることが明らかとなった。本断片中には、液化型アルカリ α -アミラーゼのものと推定されるORFの終止コドンが存在した。

【0029】

実施例4

次に、KSM-AP1378株から精製された液化型アルカリ α -アミラーゼのN末端アミノ酸配列(7アミノ酸)を基にしてプライマーをデザイン(図3)し合成した。本プライマー(プライマー5)と前述のプライマー3(図3)及び鋳型としてKSM-AP1378株の染色体DNAを用いてPCRによって約0.7kbの遺伝子断片(断片C)を増幅し(図1)その塩基配列を決定した。

【0030】

実施例5

精製酵素のN末端アミノ酸配列のすぐ下流21塩基配列からなるプライマーを合成し(プライマー6)、プライマー6とプライマー7(図1、図3)及びHindIIIで消化されたKSM-AP1378株の染色体DNAを分子内結合したDNA群を鋳型として用いて逆PCR法によって上流側0.8kbの断片(断片D)と下流側PstI-HindIII 0.4kb断片がHindIII部位で結合した1.2kb断片が得られた。このうち断片D領域の塩基配列を決定したところ、MKLHNRIISVLLTLLAVAVLFPYMTPEPAQA(配列番号2中の1~31まで)の31アミノ酸よりなるシグナル配列、AAGGAGよりなる推定SD配列[塩基127~132; Mclaughlin, J. R. et al., J. Biol. Chem., 260, 7178 (1985)]、2種の推定プロモーター配列(-35配列, TTGAAA; -10配列, TATGGT及び-35配列, TTGACT; -10配列, TAAATT)等が検出された。

【0031】

実施例6

プロモーター配列の約0.1 kb上流位置のプライマーAと終始コドンから79 b下流位置のプライマーB及びKSM-AP1378株の染色体DNAを鋳型としてプライマー間約1.8 kbをPCR増幅した。増幅断片をpUC19のSma I部位に挿入し、大腸菌HB101株に導入した。形質転換体をブルースターチ入りのLB寒天培地上で生育させ、透明なハローをコロニー周辺に形成した株を液化型 α -アミラーゼ活性を生産する組換え大腸菌として分離した。組換え大腸菌株から、組換えプラスミドを調製し制限酵素切断地図を作製したところ、図1に示した約1.8 kbのDNA断片（断片E）が含まれていることが確認でき、この組換えプラスミドをプラスミドpAML100と命名した（図2）。

【0032】

実施例7

実施例6において得られた組換え大腸菌をアンピシリン50 μ g/ml入りの5 mlのLB液体培地で12時間浸透培養し、この培養液1 mlを100 mlのLB培地（テトラサイクリンを含む）に接種して、37℃で24時間振盪培養した。遠心分離によって集めた菌体をトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）に懸濁し、超音波による破碎を行った。破碎後、遠心分離によって不溶物を取り除き、得られた上清液を無細胞抽出液とした。対照として、HB101（pBR322）株についても同様に無細胞抽出液を調製し、これらの α -アミラーゼ活性を測定した。尚、 α -アミラーゼ活性は50 mMグリシン-NaCl-NaOH緩衝液（pH10）中に可溶性澱粉を含む反応液中、50℃で、15分間の反応を行った後生成した還元糖を3,5-ジニトロサリチル酸法（WO94/26881）で定量することによって測定した。酵素の力価は、1分間に1 μ molのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。この結果、HB101（pAML100）株の無細胞抽出液には α -アミラーゼ活性が認められ、更に α -アミラーゼの作用至適pHを求めたところ、pH8～9の間であることが明らかとなった。この値はバチルス エスピー-KSM-AP1378株の生産する液化型 α -アミラーゼの至適pH（図4）と一致するものであった。尚、酵素活性の測定には、次表に示した緩衝液（各々40 mM）を用いた。

【0033】

【表2】

pH 範囲	緩 衝 液
pH 3.5～5.5	酢酸緩衝液
pH 5.5～8.5	トリス-マレイン酸緩衝液
pH 8.5～10.5	グリシン-NaCl-NaOH緩衝液
pH 10.5～11.0	Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ 緩衝液

【0034】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：516

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Lys Leu His Asn Arg Ile Ile Ser Val Leu Leu Thr Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ala Val Ala Val Leu Phe Pro Tyr Met Thr Glu Pro Ala Gln Ala His
20 25 30
His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His Leu
35 40 45
Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala Asn
50 55 60
Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp Lys
65 70 75 80
Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp
85 90 95
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
100 105 110

Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly Ile
 115 120 125
 Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 130 135 140
 Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn Gln
 145 150 155 160
 Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 165 170 175
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 180 185 190
 Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys Ile
 195 200 205
 Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Ile
 210 215 220
 Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp
 225 230 235 240
 His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr
 245 250 255
 Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile
 260 265 270
 Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr Thr
 275 280 285
 Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Ala
 290 295 300
 Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val Phe
 305 310 315 320
 Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly Gly
 325 330 335
 Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys His

4

4

4

4

4

4

4

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: バチルス エスピー

株名: KSM-AP1378

配列

ATATAAATTT GAAATGAACA CCTATGAAAA TATGGTAGCG ATTGCGCGAC GAGAAAAAAC	60
TTGGGAGTTA GGAAGTGATA TTAAAGGATT TTTTGTGACT TGTTGTGAAA ACGCTTGCAT	120
AAATTGAAGG AGAGGGTGCT TTTT ATG AAA CTT CAT AAC CGT ATA ATT AGC GTA	174
Met Lys Leu His Asn Arg Ile Ile Ser Val	
1 5 10	
CTA TTA ACA CTA TTG TTA GCT GTA GCT GTT TTG TTT CCA TAT ATG ACG	222
Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ala Val Ala Val Leu Phe Pro Tyr Met Thr	
15 20 25	
GAA CCA GCA CAA GCC CAT CAT AAT GGG ACG AAT GGG ACC ATG ATG CAG	270
Glu Pro Ala Gln Ala His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln	
30 35 40	
TAT TTT GAA TGG CAT TTG CCA AAT GAC GGG AAC CAC TGG AAC AGG TTA	318
Tyr Phe Glu Trp His Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu	
45 50 55	
CGA GAT GAC GCA GCT AAC TTA AAG AGT AAA GGG ATT ACC GCT GTT TGG	366
Arg Asp Asp Ala Ala Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp	
60 65 70	
ATT CCT CCT GCA TGG AAG GGG ACT TCG CAA AAT GAT GTT GGG TAT GGT	414
Ile Pro Pro Ala Trp Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly	
75 80 85 90	
GCC TAT GAT TTG TAC GAT CTT GGT GAG TTT AAC CAA AAG GGA ACC GTC	462
Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val	
95 100 105	
CGT ACA AAA TAT GGC ACA AGG AGT CAG TTG CAA GGT GCC GTG ACA TCT	510

Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Arg Ser Gln Leu Gln Gly Ala Val Thr Ser	
110 115 120	
TTG AAA AAT AAC GGG ATT CAA GTT TAT GGG GAT GTC GTG ATG AAT CAT	558
Leu Lys Asn Asn Gly Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His	
125 130 135	
AAA GGT GGA GCA GAC GGG ACA GAG ATG GTA AAT GCG GTG GAA GTG AAC	606
Lys Gly Gly Ala Asp Gly Thr Glu Met Val Asn Ala Val Glu Val Asn	
140 145 150	
CGA AGC AAC CGA AAC CAA GAA ATA TCA GGT GAA TAC ACC ATT GAA GCA	654
Arg Ser Asn Arg Asn Gln Glu Ile Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala	
155 160 165 170	
TGG ACG AAA TTT GAT TTC CCT GGA AGA GGA AAT ACC CAT TCC AAC TTT	702
Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe	
175 180 185	
AAA TGG CGC TGG TAT CAT TTT GAT GGG ACA GAT TGG GAT CAG TCA CGT	750
Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg	
190 195 200	
CAG CTT CAG AAC AAA ATA TAT AAA TTC AGA GGT ACC GGA AAG GCA TGG	798
Gln Leu Gln Asn Lys Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp	
205 210 215	
GAC TGG GAA GTA GAT ATA GAG AAC GGC AAC TAT GAT TAC CTT ATG TAT	846
Asp Trp Glu Val Asp Ile Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr	
220 225 230	
GCA GAC ATT GAT ATG GAT CAT CCA GAA GTA ATC AAT GAA CTT AGA AAT	894
Ala Asp Ile Asp Met Asp His Pro Glu Val Ile Asn Glu Leu Arg Asn	
235 240 245 250	
TGG GGA GTT TGG TAT ACA AAT ACA CTT AAT CTA GAT GGA TTT AGA ATC	942
Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile	
255 260 265	

GAT GCT GTG AAA CAT ATT AAA TAC AGC TAT ACG AGA GAT TGG CTA ACA	990
Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr Ser Tyr Thr Arg Asp Trp Leu Thr	
270 275 280	
CAT GTG CGT AAC ACC ACA GGT AAA CCA ATG TTT GCA GTT GCA GAA TTT	1038
His Val Arg Asn Thr Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe	
285 290 295	
TGG AAA AAT GAC CTT GCT GCA ATC GAA AAC TAT TTA AAT AAA ACA AGT	1086
Trp Lys Asn Asp Leu Ala Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser	
300 305 310	
TGG AAT CAC TCC GTG TTC GAT GTT CCT CTT CAT TAT AAT TTG TAC AAT	1134
Trp Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn	
315 320 325 330	
GCA TCT AAT AGT GGT GGC TAT TTT GAT ATG AGA AAT ATT TTA AAT GGT	1182
Ala Ser Asn Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly	
335 340 345	
TCT GTC GTA CAA AAA CAC CCT ATA CAT GCA GTC ACA TTT GTT GAT AAC	1230
Ser Val Val Gln Lys His Pro Ile His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn	
350 355 360	
CAT GAC TCT CAG CCA GGA GAA GCA TTG GAA TCC TTT GTT CAA TCG TGG	1278
His Asp Ser Gln Pro Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Ser Trp	
365 370 375	
TTC AAA CCA CTG GCA TAT GCA TTG ATT CTG ACA AGG GAG CAA GGT TAC	1326
Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr	
380 385 390	
CCT TCC GTA TTT TAC GGT GAT TAC TAC GGT ATA CCA ACT CAT GGT GTT	1374
Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val	
395 400 405 410	
CCT TCG ATG AAA TCT AAA ATT GAT CCA CTT CTG CAG GCA CGT CAA ACG	1422
Pro Ser Met Lys Ser Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr	

415	420	425	
TAT GCC TAC GGA ACC CAA CAT GAT TAT TTT GAT CAT CAT GAT ATT ATC			1470
Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile			
430	435	440	
GGC TGG ACG AGA GAA GGG GAC AGC TCC CAC CCA AAT TCA GGA CTT GCA			1518
Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala			
445	450	455	
ACT ATT ATG TCC GAT GGG CCA GGG GGT AAT AAA TGG ATG TAT GTC GGG			1566
Thr Ile Met Ser Asp Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly			
460	465	470	
AAA CAT AAA GCT GGC CAA GTA TGG AGA GAT ATC ACC GGA AAT AGG TCT			1614
Lys His Lys Ala Gly Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser			
475	480	485	490
GGT ACC GTC ACC ATT AAT GCA GAT GGT TGG GGG AAT TTC ACT GTA AAC			1662
Gly Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn			
495	500	505	
GGA GGG GCA GTT TCG GTT TGG GTG AAG CAA TAAATAAGGA ACAAGAGGCG			1712
Gly Gly Ala Val Ser Val Trp Val Lys Gln			
510	515		
AAAATTACTT TCCTACATGC AGAGCTTTCC GATCACTCAT ACACCCAATA TAAATTGGAA			1772
GCTT			1776

【図面の簡単な説明】

【図1】

液化型アミラーゼ遺伝子断片の制限酵素地図を示す。

【図2】

液化型アミラーゼ遺伝子断片を用いたpAML100構築図を示す。

【図3】

各プライマー配列図を示す。

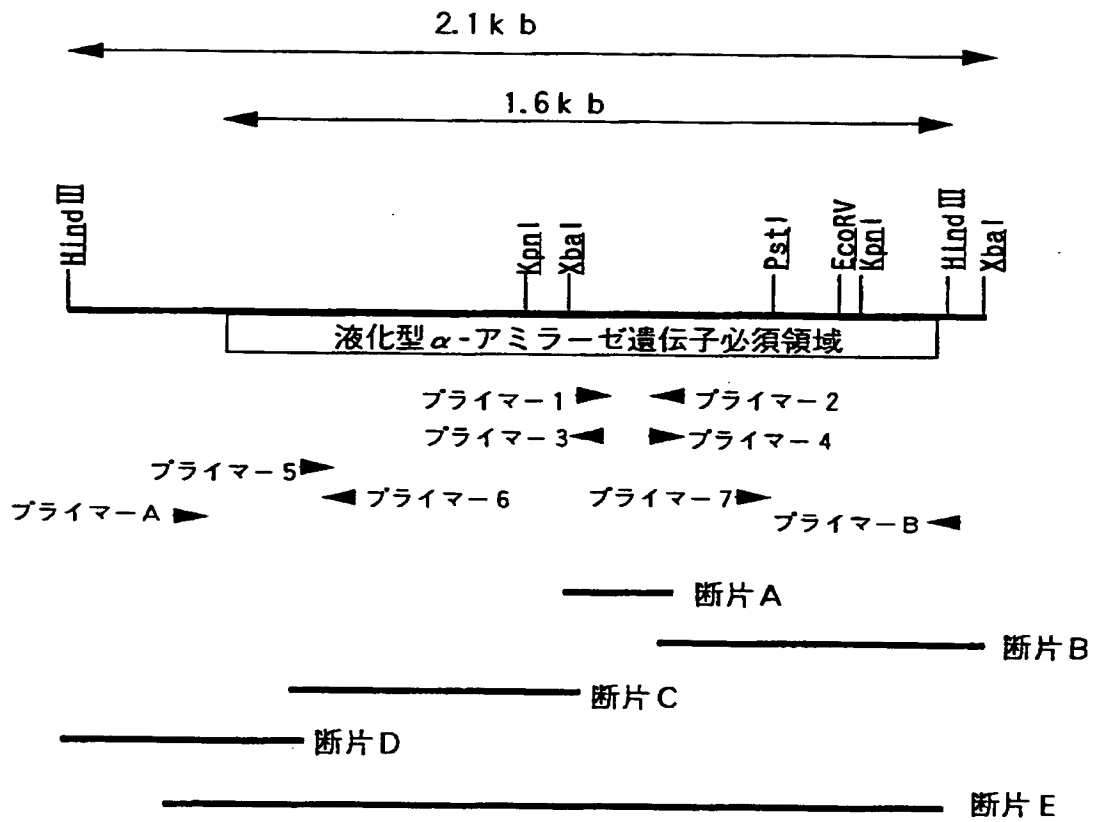
【図4】

特平 7-147257

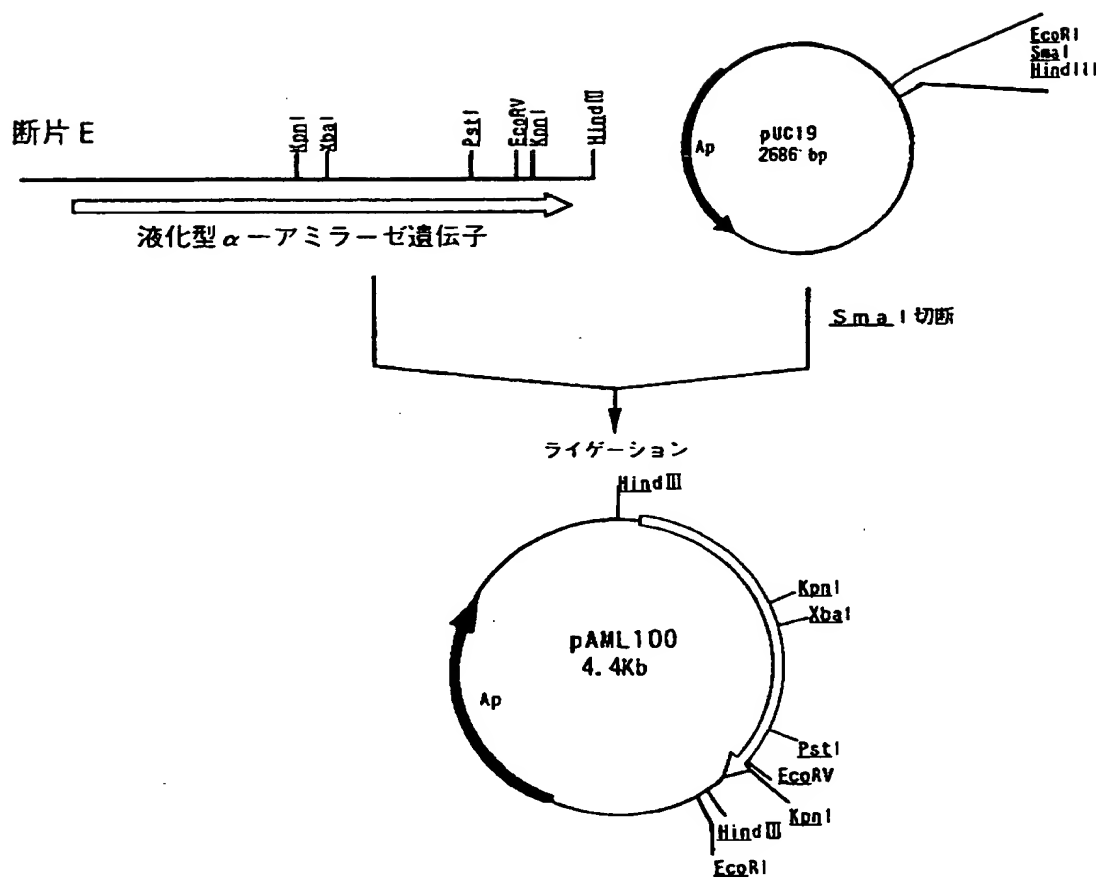
バチルス エスピー KSM-AP1378株の生産する液化型 α -アミラーゼのpHプロフィールを示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【図3】

プライマー1 5' TAGACGCAGTAAAACACATAAA 3'
 C T C C G T C
 G G G T
 T T T

プライマー2 CGACAATGAAAACAACCTATTAGTACT
 G G G G G G G
 C C C C
 T T T T

プライマー3 AGCCAATCTCTCGTATAGCTGTA

プライマー4 GTACAAAAACACCTATACATG

プライマー5 AATGGAACAATGATGCAGTA
 T T T

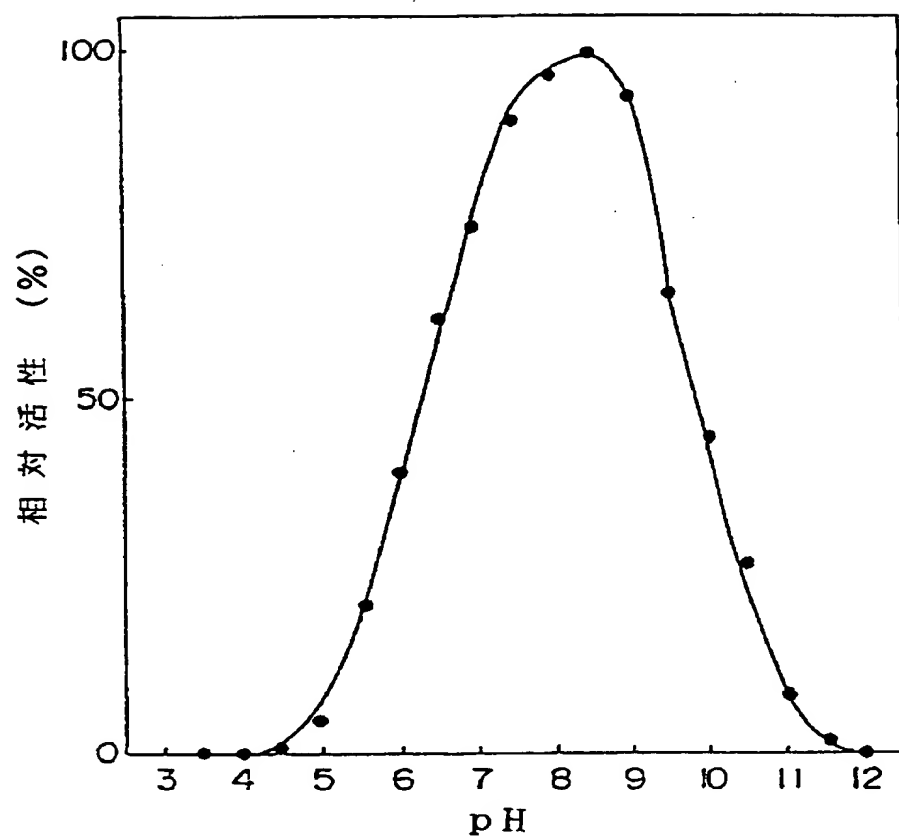
プライマー6 CATTTGGCAAATGCCATTCAAA

プライマー7 AAAATTGATCCACTTCTGCAG

プライマーA CAGCGCGTGATAATATAAATTTGAAT

プライマーB AAGCTTCCAATTTATATTGGGTGTAT

【图4】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 液化型アルカリ α -アミラーゼをコードするDNA断片、これを含む組換えDNA及び当該組換えDNAを保持する形質転換微生物。

【効果】 洗浄剤成分等として有用な液化型アルカリ α -アミラーゼの大量生産が可能である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
【氏名又は名称】 花王株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100068700
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル
【氏名又は名称】 有賀 三幸
【選任した代理人】
【識別番号】 100077562
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 高野 登志雄
【選任した代理人】
【識別番号】 100096736
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1-3-6 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
【識別番号】 100101317
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

特平 7-147257

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000918]

1. 変更年月日

1990年 8月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

氏 名

花王株式会社